продуктов с такими «маркерами» способно снизить эффективность антибиотиков, если они принимаются вместе. Во-вторых, использование генов, устойчивых к антибиотикам, может привести к тому, что болезнетворные бактерии сами приобретут устойчивость к антибиотикам.

Опросы во многих странах показывают, что большинство населения не знает о существовании ГМО, и всего лишь 1% населения знает и о вреде их, и о пользе. Человек сам должен выбирать, какими продуктами ему питаться, а для этого трансгенные продукты должны маркировать. С 1 июня 2004 года в России введена обязательная маркировка пищевых продуктов. Все продукты питания в России будут разделены на 3 группы по содержанию генетически модифицированных организмов. На упаковке всех отечественных и импортных продуктов появится маркировка: «произведено без применения ГМО», «произведено с применением ГМО», «произведено из ГМО».

Многие предприятия по производству продуктов питания постоянно поставляют свою продукцию на анализ. Так, в Нижегородской области масложиркомбинат предоставил 35 проб разной продукции, и ни в одной не было обнаружено ГМ-компонентов. Продукция Сормовской кондитерской фабрики, Ильиногорского и Дзержинского мясокомбинатов также не содержат ГМ-компонентов. Их продукцию можно смело употреблять в пищу, чего не скажешь о такой известной фирме как «Проктэр энд Гэмбл» и «Нестле». Результаты тестов, выполненных лабораторией «Биоком», показали, что сухая молочная смесь «Нестоген» («Нестле», Швейцария), сухая питательная смесь «Алфаре» («Нестле», Нидерланды) и пюре «Овощи с говядиной» («Нестле», Финляндия) содержали от 5 до 100% ГМ-сои.

Таким образом, генетически модифицированные продукты стали одним из достижений биологии XX в. Основной вопрос, безопасны ли такие продукты для биосферы и человека как одной из ее составляющих, пока остается без ответа.

Помимо безопасности для здоровья человека, активно обсуждается вопрос, какую потенциальную угрозу несут биотехнологии для окружающей среды. Природа риска при получении и использовании генетически модифицированных организмов настолько многообразна, что даже его систематизация – достаточно сложная задача.

Данных о функционировании измененной ДНК явно недостаточно. Действительно, генно-инженерные технологии начали применять сравнительно недавно, и пока мы не знаем, как будут вести себя измененные организмы и их потомки через 20, 50 и более лет. Нельзя предусмотреть последствия взаимодействия измененных организмов с их дикими родственниками, и, как следствие, возможно непредсказуемое изменение биоценозов. Генетически модифицированные организмы могут переноситься насекомыми и птицами на достаточно далекие расстояния, что также будет изменять устойчивые, складывавшиеся веками биоценозы.

SUMMARY

Genetically modified products began one of achievements of biology of XX century. The basic question, whether such products for biosphere and the person as one of her components while remains without the answer are safe.

Литература

1. Берестов, А.И. Удар по здоровью / А.И. Берестов, Е.П. Горская, Н.Н.Николаева // М., 2003.
2. Балиев А. Генетика спасет от голода. Но продлит ли она жизнь?// Молодая гвардия, 2001. № 4.
3. Чечилова С. Трансгенная пища // Здоровье, 2000, №6

УДК619:616.981.42

А.Л. Воробьев

(ДГП «Научно-исследовательский ветеринарный институт», Алматы)

ЛИЗОГЕНИЯ И ДИССОЦИАЦИЯ БРУЦЕЛЛ

Несмотря на успехи, достигнутые в изучении бактериофагов, до сих пор точно не установлена их биологическая роль в биоценозе. Вероятно, наиболее древними и наиболее простыми паразитарными системами являлись вирусные инфекции бактерий, вызываемые соответствующими фагами. Размножающийся в клетке «дикий» фаг обычно лизирует ее, чем обеспечивается выход потомства фаговых частиц. Однако эта форма инфекции оказывается несостоятельной, так как высокая восприим-

чивость популяций к литическому действию фагов ведет в конечном итоге к гибели обеих взаимодействующих сторон. Указанное противоречие преодолевается образованием умеренных фагов, которые длительно колонизируют популяцию бактерий и могут воспроизводиться как часть их наследственного аппарата, не подавляя жизненные функции и способность к размножению клеток хозяев [1].

Иммунитет бактерии, зараженной умеренным фагом, заключается не только в препятствии ее инфицирования, но (что важнее) и в сдерживании размножения эндогенного профага с помощью цитоплазматического фактора, продуцируемого самим профагом. Следовательно, в основе «умеренности» умеренных фагов лежит их способность вызывать синтез собственного репрессора. Приведенный пример демонстрирует проявление саморегуляции, подтверждающей общее правило, что эволюция не дает больших селективных преимуществ ни одному из взаимодействующих видов. Она направлена на достижение противоречивого равновесия, обеспечивающего сохранение каждого из них [2].

Согласно гипотезе, предложенной В.В. Макаровым и др. [3], важное значение приобретают патогены необычной природы, к которым условно, только на основе их субвирусной молекулярной организации можно отнести три группы патогенных агентов – прионы, вироиды и трансмиссивные генетические детерминанты патогенности (ТГДП), к которым относятся плазмиды, транспозоны и фаги. ТГДП ведут себя как генетические симбионты и даже паразиты, сами обусловливают инфекционный процесс при заражении бактериальных клеток как хозяев первого порядка.

Регуляторные функции внехромосомных факторов наследственности являются объектом интенсивного изучения, что связанно с их значением в контроле реализации генетической информации микроорганизмов. Ведущая роль в регуляторных процессах принадлежит, по-видимому, элементам, способным транслоцироваться и встраиваться в негомологичные участки хромосомы различных микроорганизмов, фагов и плазмид. Для них характерна незначительная рекомбинация, не требующая протяженных участков гомологии. К таким нуклеотидным последовательностям относятся IS-элементы, транспозоны и геномы части умеренных фагов. К мигрирующим элементам отнесены фаги, обнаруживаемые у родов Escherichia, Psevdomonas, Vibrio. Процесс их интеграции очень похож на таковой у IS- элементов и транспозонов. Такие бактериофаги способны встраиваться в самые различные участки хромосом и содержащиеся в ней плазмиды, вызывая соответствующие эффекты. Этот процесс в значительной степени зависит как от рекомбинационных механизмов фага, так и бактерии-хозяина. Вызываемые им эффекты обратимы, и исходный фенотип может восстанавливаться при удалении профага [4].

С эволюционной точки зрения бактериофаги можно рассматривать как особый класс плазмид, накопивших наследственную информацию, необходимую для синтеза белковой головки фага, в которую заключается генетический материал. Таким образом, эволюция фаговой ДНК привела к образованию инфекционных плазмид, которые в одеянии фаговых частиц способны существовать вне протоплазмы и в таком виде переходить от одного хозяина к другому [1].

Являясь по своей природе носителями собственной, т.е. чужеродной для реципиентов, генетической информации, плазмиды, транспозоны и фаги сообщают бактериям многие дополнительные свойства. Благодаря этому бактерии-реципиенты приобретают способность реализовывать многочисленные полезные функции, дающие им разнообразные селективные преимущества, в том числе и патогенность. В этой связи можно предположить, что патогенность проявляется не за счет неких условий или даже мутационного процесса, а является следствием микроэволюционных процессов двухуровневого порядка в популяциях ТГДП, как материальных носителей патогенности, самостоятельных этиологических агентов той или иной формы патогенности. Бактерии-хозяева ТГДП являются лишь экологическими носителями и векторами последних. В этом случае бактерии являются не возбудителями в тривиальном представлении, а как носители и хозяева истинных возбудителей, т.е. ТГДП, экологически связанные с ними симбиопаразитологическими отношениями. Иными словами, эпидемический процесс возможен как вторичный, при заносе в популяцию бактерий той или иной ТГДП и развитие первичного эпидемического процесса – возникновения, распространения и затухания инфекции на этом уровне на основе межпопуляционных взаимодействий ТГДП и их хозяев по аналогии с саморегулирующимися паразитарными системами [3].

Паразиты не только способны уклонятся от защитных механизмов своих хозяев, но и обладают качествами, позволяющими совершенствовать этот процесс. У них существует широчайший спектр способов избегать воздействия защитных механизмов организма хозяина. Это включение геномов умеренных вирусов (бактериофаги, ретровирусы) в хромосому клетки (от бактериальных до многоклеточных организмов) с их «вертикальной» передачей, т.е. наследованием (вирогения, лизогения), с помощью плазмид у бактерий, содержащих гены резистентности по отношению к специфическим и неспецифическим факторам иммунитета [5].

На примере фагов давно показано, что их нуклеиновые кислоты обладают значительным потенциалом лабильности или инвазивности. Они способны не только сами проникать в клетки прокариотов и эукариотов и их геном, но и переносить с собой участки ДНК (РНК) предыдущего хозяина. Плазмиды могут представлять видоизмененные геномы фагов или других вирусов, объединившихся с геномом микроба-реципиента. Последний может быть микроб, входящий в нормальную микрофлору макроорганизма. При попадании извне в организм недостающего компонента, геномы объединяются, и запускается механизм накопления вирулентного микроба. Практической реализацией представленной концепции стратегии популяции микробов можно считать то, что ее следует учитывать при разработке средств и методов профилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний [6].

Одним из способов передачи генетической информации является трансдукция – перенос небольшого фрагмента ДНК бактерии-донора с помощью фага. Следствие ее – изменение генотипа реципиентной клетки за счет фрагмента генома донорской бактерии. В популяции вирулентных или умеренных фагов, образовавшихся в фагочувствительных или лизогенных бактериях, вследствие индукции в последних профагов, трансдуцирующие фаги, способные перенести часть ДНК донорской бактерии реципиентной клетке, встречаются от 1: 10 до 1:10 фаговых частиц данной популяции. ДНК умеренного фага в инфицированной (лизогенизированой) фагочувствительной бактериальной клетке интегрирует с хромосомой бактерии и остается в ней в форме профага. Теперь ДНК умеренного фага реплицируется вместе с ДНК лизогенной бактерии [7].

Показана возможность трансдукции одного и того же признака различными фагами. Так, стафилококовые фаги 52, 53, 80 трансдуцировали о признак пенициллинорезистентности с частотой 4-10” . С другой стороны одним фагом удалось формировать рекомбинанты с различными типами лекарственной устойчивости: к тетрациклину, стрептомицину, пенициллину. Полученные данные свидетельствуют о существовании в генетической структуре плазмиды, как единого для всех, генетического локуса, так и локусов различных в функциональном отношении [8].

Главным фактором вирулентности Salmonella и многих других видов бактерий является система секреции, позволяющая переносить эффекторные белки патогена в клетки эукариот и модулировать таким образом передачу сигналов в клетках хозяина. Эффекторные белки Sal. typhimurium кодируются генами, расположенными преимущественно в островке патогенности (ОП-1). Получены данные о том, что ген sop E, найденный только в некоторых изолятах сальмонелл, локализован не в ОП-1, а в умеренном фаге Sop EФ. В результате лизогенной конверсии этот фаг может горизонтально переносить гены в различные штаммы Sal. typhimurium, поэтому он может быть причиной появления новых эпизоотических штаммов. [9].

Организм хозяина взаимодействует с геномом паразита. Особенно ярким примером этого процесса может служить лизогенизация бактерий умеренным фагом. Так, в регуляции выражения генов интеграции или эксцизии профага А, участвуют белки, кодируемые самим фагом, и бактерией E. coli. Лизогенные клетки приобретают род новых признаков, определяемых присутствием профага, например, иммунность к повторному заражению гомологичным фагом. Паразиты обогащают генофонд популяций свободноживущих и паразитических организмов, стимулируют его к дальнейшему развитию и совершенствованию, отбирают наиболее жизнеспособные популяции паразитов и их хозяев, способствуют развитию их защитных механизмов и повышают способности паразитических и хозяинных видов и популяций к взаимной адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды [5].

Лизогения чрезвычайно широко распространенное явление, встречающееся у штаммов самых различных видов бактерий, которое можно рассматривать как вполне нормальное физиологическое со-

стояние бактерий, возникающее в процессе эволюции и способствующее сохранению данного вида. Весьма интересной особенностью лизогенных бактерий является и тот факт, что в лизогенной клетке не обязательно присутствует только один какой-либо фаг. Описано много случаев лизогенности по двум, трем и более типам фага. При заражении умеренным фагом клетка, помимо иммунитета, может приобретать и некоторые другие свойства. Такой способ приобретения бактериальной клеткой новых признаков получил название фаговой конверсии. При этом было показано, что фаги могут переносить самые различные признаки: способность сбраживать различные углеводы, резистентность к антибиотикам, способность к спорообразованию и т.п., наконец сама лизогенность является признаком, который может быть передан от донора к реципиенту. Важно отметить, что бактерии и умеренные фаги выступают как единая генетическая система, так как при лизогении и фаговой конверсии фаговый геном составляет часть бактериального генома, а при трансдукции фрагмент бактериального генома входит в геном фага. И в этой генетической системе возможен генетический обмен как внутривидовой, так и между различными видами, преимущественно экологически и филогенетически связанных между собой [5,10].

Как установлено, явление лизогении широко распространено у бруцелл. Так, эпизоотические культуры бруцелл оказались на 70-100% лизогенными [11,12].

Н.Н. Островская [13] обнаружила, что естественно лизогенные культуры бруцелл находятся в различном состоянии: типичные, высоковирулентные в S-форме, стойко сохраняющие свои свойства при оптимальных условиях их содержания; неустойчивые S-формы, быстро переходящие в состояние диссоциации, а также культуры со значительно измененными фенотипическими свойствами. Общими биологическими показателями для всех измененных под влиянием фага форм являлось состояние диссоциации, выраженное в разной степени у разных культур, разная степень ослабления вирулентности, а также изменение серологической специфичности. Видовые признаки лизогенных форм оказались наиболее стабильными. Выявление значительного числа (62%) культур бруцелл-носителей латентного фага (естественно лизогенных культур) дает основание считать, что именно профаг, фиксированный в разных локусах хромосомы клеток бруцелл, и является причиной изменчивости их генома, а, следовательно, изменения их метаболизма и функций.

У измененных воздействием фага бруцелл полисахаридные и белковые компоненты отличались от соответствующих компонентов антигена исходной культуры. Наиболее устойчивые химические изменения произошли в составе антигенного комплекса, а наиболее стойким из вновь приобретенных свойств являлась ослабленная вирулентность. Можно предположить, что у фагорезистентных вариантов, обладающих качественно иными, отличными комплексами, на поверхности клеток происходит замена одних активных группировок другими. Последнее обстоятельство, вероятно, связано с потерей определенных рецепторов, может служить своеобразным защитным механизмом от проникновения фага внутрь микроорганизма [14].

Важно отличать вирусную конверсию от трансдукции. При конверсии каждая бактерия, инфицированная фагом, может проявлять новый фенотип, контролируемый фаговыми генами до тех пор, пока в клетке присутствует фаг или профаг; другими словами, изменение обусловлено информацией, связанной с фагом, и может затрагивать большое количество бактериальных клеток. С другой стороны, при трансдукции, отдельная фаговая частица (бактериофаг) может переносить бактериальные гены от одной бактерии в другую и в результате геном бактерии может рекомбинировать с участком генома фага, несущим генетическую информацию от другой бактерии. Иными словами, это изменение не зависит от последующего присутствия фага или профага; оно обусловлено скорее бактериальной, а не вирусной информацией [15].

Располагая набором бруцеллезных фагов различного происхождения и штаммами ауксотрофами B. suis 705 был осуществлен процесс трансдукции. Эксперименты проводили фаголизатами, обработанными ДНК-зой. Установлено, что трансдукционный внутри- и межвидовой перенос могут осуществлять фаги 9708 и IP 32/3. С наибольшей эффективностью при стабильном наследовании фаги трансдуцировали признак Trp+ и stv R [16].

Показано, что B. abortus могут сохранять в себе и передавать различные плазмиды: pTH-10, pSa и S-751. Описана также передача через плазмиды хромосомных генов B. abortus к E. coli и изоляция бруцеллезных генов для ДНК-синтеза с исполь-

зованием плазмидсвязанной хромосомной мобилизации для создания авирулентных штаммов бруцелл, характеристики вирулентных факторов и, в конечном итоге, для усовершенствования бруцеллезных антигенов и вакцин [17].

Изменение свойств бактерий, в том числе способности к передачи генов, тесно связанно с фаговой конверсией. При этом типе взаимодействия свой фенотип изменяют индуцированные фагом бактерии. Многие свойства конвертирующих фагов, связанных с их влиянием на изменчивость бактерий, стали понятны после открытия мигрирующих и встраивающихся элементов. В составе фагов обнаружили транспозоны, определяющие устойчивость к различным антибиотикам, способность утилизировать углеводы, синтезировать термостабильный эндотоксин и др. Кроме того, транспозоны, переносимые фагами могут обеспечивать процесс интеграции последних в хромосому клетки. Транспозоны, привносимые умеренными фагами, могут мигрировать на репликоны клетки хозяина. Такое перемещение оказывает влияние на реализацию клеточной информации, а также обеспечивает сохранение привнесенного признака после элиминации фага-переносчика. Сам фаг в лизогенном состоянии может индуцировать изменение поверхностных структур бактериальных клеток, что предотвращает адсорбцию и их инфекцию другими фагами [4].

Фаговая конверсия изменяет антигенные свойства не только лизогенизированных, но и чувствительных к фагу бактерий, которые в дальнейшем лизируются. Это говорит о том, что информация, касающаяся синтеза антигена, не обязательно локализована в пределах обычной полинуклеотидной информации бактерий. Информацию, необходимую для образования (или активизации) фермента, контролирующего синтез компонентов клеточной поверхности, очевидно, несет ДНК некоторых фагов, даже в том случае, если она не интегрирована полностью с бактериальной ДНК. Сам процесс конверсии протекает очень быстро: новый антиген синтезируется спустя несколько минут после заражения клетки фагом и не исчезает до тех пор, пока клетка находится в лизогенном состоянии или, если это вирулентный фаг, вплоть до наступления лизиса [15].

Исследования последних лет показывают, что у разных микроорганизмов имеются различные факторы или свойства, связанные с вирулентностью. Вирулентность является биологическим признаком полидетерминантного характера, и патогенные виды обладают эволюционно сложившимися генетическими детерминантами, контролирующими синтез многочисленных факторов патогенности [10]. О том, что умеренные или конвертирующие фаги служат переносчиками факторов патогенности является и тот факт, что фагорезистентные (лизогенные) микроорганизмы очень часто бывают более вирулентными, чем фагочуствительные клетки [18].

Изучение биологических свойств бруцелл, после их взаимодействия со специфическими фагами в наших экспериментах, свидетельствовало о значительном повышении вирулентности популяции бруцелл, измененных под влиянием фагов [19], что подтверждает данные, полученные И.Ф. Тараном и др. [20].

Таким образом, генетический обмен между бактериями, осуществляемый умеренными фагами, играет существенную роль в формировании их патогенных свойств, что служит причиной локализации многих детерминант вирулентности, обнаруживаемых вне бактериальной хромосомы и являющихся трансмиссивными [21,22].

Наряду с этим, наличие среди лизогенных культур, бруцелл с неизмененным фенотипом, дает основание предполагать, что воздействие различных факторов внешней среды на такие культуры может индуцировать у них изменения ряда фенотипических признаков и тем самым индуцировать возникновение измененных форм, что, очевидно, и имеет место в природных условиях. При воздействии фага ТБ на типичную нелизогенную культуру Br. abortus 146 показано, что наряду с лизисом клеток в популяции образуются формы бруцелл с широким диапазоном изменчивости морфологии колоний и клеток. Большой диапазон морфологической изменчивости сочетается с однотипным изменением биологических свойств культур полученных вариантов: состояние диссоциации, ослабление вирулентности и полная утрата агглютинабильности. Глубина этих изменений у культур разных вариантов оказалось разной. Отмечено, что в организме животного. восстановление биологических свойств происходит быстрее. Однако, в этих условиях процесс восстановления вирулентности затягивается у большинства культур, отставая от восстановления других биологических признаков. [23].

Особо следует остановиться на явле-

нии смены способов жизни: паразитического на комменсальный или мутуалистический и, наоборот, мутуалистического или комменсального – на паразитический. Эти процессы запрограммированы в геноме некоторых паразитов (например, у умеренных фагов и др.) или обусловлены генными перестройками вследствии трансдукции генов патогенности (транспозонами, плазмидами, умеренными фагами), их мутаций, эксцизий и т.д. Они провоцируются организмом хозяина или факторами окружающей среды второго порядка [5].

Без учета изменений биологических свойств возбудителей заболеваний не могут быть поняты многие изменения в эпидемиологии и течение инфекционных болезней, а также организованы достаточно эффективные мероприятия по борьбе с ними. Особенно быстро изменяются микробы в организме (животных, человека). Это положение относится к нормальной микрофлоре и к патогенным микроорганизмам. Объясняется это тем, что для указанных микробов организм является основной, а для некоторых из них и единственно возможной средой обитания. Следовательно, если бы такие микробы не выработали в процессе эволюции способность быстро изменяться, приспосабливаясь к меняющимся условием существования в организме, они бы не смогли выжить, гибель данного микробного вида была бы неизбежна [24].

К настоящему времени накопилось большое количество данных, которые позволяют рассматривать диссоциацию как один из общих и универсальных механизмов, присущий популяциям микроорганизмов и обеспечивающий поддержание их соответствия меняющимся условиям внешней среды. Диссоциация микроорганизмов имеет как общие, так и индивидуальные черты, к первым можно отнести наличие у всех микроорганизмов в качестве крайних вариантов диссоциации клеток, образующих гладкие и шероховатые формы колоний. Индивидуальными являются большое количество вариантов с самыми разнообразными комбинациями свойств, присущих S- и R-формам, а также отличные от них. Важна для понимания роли диссоциации в саморегуляции микробных популяций возможность обратного процесса реверсии. Бруцеллы диссоцировали от S- к R-форме и затем были способны восстанавливать свой первоначальный фенотип. Возникающий S-тип был по антигенным свойствам аналогом исходного, но в значительной степени отличался по ассоциированному признаку устойчивости к аланину. Полученные в последние годы данные свидетельствуют об участии в процессе диссоциации различных факторов наследственности, а именно бактериофагов, плазмид и, вероятно, мигрирующих генетических элементов, обуславливающих высокую частоту диссоциативного процесса [4].

Внехромосомными факторами, вызывающими диссоциацию у некоторых микроорганизмов (микобактерий, нокардий, коринебактерий, холерных вибрионов и др.) являются бактериофаги. При обработке M.smegmatis бактериофагами (Rb Д29, Д52) частота S-R-перехода с 10-3 увеличивается до 10-1-10-2. Большинство образовавшихся при этом R-форм были лизогенными. Делизогенизации сопутствовал R-S-переход [25].

Большая частота диссоциации, зарегистрированная у вибрионов Эль-Тор, также связана с конверсией бактериофагами. При лизогении фагами VII, VIII и 8556 возникал 100% переход из S- в R-форму. Делизогенизация сопровождалась восстановлением исходного штамма в S-форме. Процесс делизогенизации мог быть повторен [26].

При изучении механизма диссоциации у M. tuberculosis 101 установили, что в R-клетках имеется дефектный профаг. При добавлении извне фага он рекомбинирует с дефектным. В М-варианте фаг находится в автономном состоянии, поскольку только в этой форме его можно элиминировать акридиновым оранжевым. Элиминация сопровождается диссоциацией М-форм в сторону образования S-форм. В данном случае также не исключено, что в активном состоянии фаг связан с плазмидой. В связи с возможностью существования у представителей одного вида различных механизмов диссоциации можно отметить, что полученные в результате элиминации фага S-формы микобактерий оставались стабильными в течение одного года и не диссоциировали [27].

При диссоциации происходят глубокие функциональные и морфологические изменения, сопровождающиеся существенной трансформацией основных биологических свойств микробов – антигенной структуры, вирулентности, инвазивности. В целом этот процесс идет по линии сапрофитизации — инвазивность у диссociантов была в среднем в 10-1000-1 млн раз ниже, чем у S-форм бруцелл. Эпизоотическая же опасность бруцелл, диссоциировавших

в естественных условиях, состоит, прежде всего, в том, что они имеют склонность к реверсии. Так, третья часть R-культур бруцелл, свежевыделенных из абортированных плодов крупного рогатого скота, при первом же пассаже через организм морских свинок реверсирует в S-форму [11].

При изучении диссоциации и вирулентности свежевыделенных штаммов бруцелл установлено, что у паразитирующих в макроорганизме и у первых генераций свежеизолированных бруцелл эписомы (фрагменты генома фага), обусловливающие синтез поверхностных липополисахаридных антигенов и ферментов – уреазы и оксидазы, находятся в автономном состоянии. С целью индуцированной элиминации эписом у первых генераций бруцелл на них воздействовали риванолом. Быстрый рост бруцелл под влиянием риванола сопровождался резким снижением их оксидазной и уреазной активности. Это свидетельствует о том, что стимулирующее влияние риванола на генетический аппарат микробных клеток, выражается в переходе эписом из автономного состояния в интегрированное с хромосомой клетки-хозяина. Результатом этих изменений в генотипе является снижением токсигенных свойств и моментальная адаптация к искусственной питательной среде дочерних клеток. [28].

В настоящее время в теории общей эпидемиологии наблюдается тенденция перехода от концепции причины как внешней силы к понятию взаимодействия внутренней причины, касающейся изменения состояния и свойств паразитарной системы как внутреннего источника «самодвижения». Саморегуляция эпизоотического процесса при бруцеллезе идет на основе взаимодействия генетически и фенотически неоднородных популяций паразита от S-, R- до L-форм возбудителя, а также хозяина, который может быть представлен одновременно 2-3 видами животных в одном очаге. Именно неоднородность взаимодействующих популяций паразита и хозяина и их изменчивость обеспечивает непрерывность эпизоотического процесса саморегулирующейся сменой фаз резервации и эпизоотического распространения возбудителя по принципу обратной связи. При прочих равных условиях заражение ими приводит к развитию бессимптомных форм инфекции. Эпизоотия постепенно затухает. У отдельных животных наступает самовыздоровление, но резервуар возбудителя сохраняется, и при определенных социальных и природных условиях эпизоотический, а вслед за этим и эпидемический процесс при бруцеллезе является необязательным для поддержания возбудителя как биологического вида, поскольку организм человека для бруцелл является «биологическим тупиком», который рассматривается не по отношению к отдельному организму, а – к человеческой популяции в целом [10].

По мнению В.Д. Белякова и др. [4] R-форма и фаг-естественная эколого-паразитарная система, появляющаяся в организме под влиянием неблагоприятных факторов, возникающая в процессе диссоциации.

Установлено, что инагглютинабельные культуры бруцелл представляют собой глубокодиссоцированные генетически закрепленные формы с резко ослабленной вирулентностью и слабовыраженным патоморфологическим воздействием на органы и ткани чувствительного животного. У инагглютинабельных культур выявлено нарушение липидного и нуклеинового обмена. В химическом составе микробной массы и антигенных комплексов отмечен дефицит ряда аминокислот и моносахаридов (по сравнению с генетически родственными агглютинабельными формами бруцелл), что и обуславливает изменение их серологической специфичности [13].

Наиболее стабильные и высоковирулентные диссоцианты при наличии способствующих экологических факторов (большая группа восприимчивых животных, условия для перезаражения) создают особые, своеобразные очаги бруцеллеза в которых циркулируют преимущественно возбудители с измененными свойствами (до 87%). Выделенные из таких очагов диссоцианты, как правило, более стабильны. Они имеют однородную популяцию. В результате чего, даже при многократном пассировании через организм морских свинок, во всех клонах показатели их биологических свойств (ферма и окраска колоний по Уайт-Вильсону, проба с трипафлавином, термоагглютинация, антигенная структура, вирулентность, инвазивность, чувствительность к фагу, краскам, пенициллину и др.) обнаруживают идентичность. Характерно, что при реверсии диссоциантов в S-клетки бруцелл, они отличаются более высокой вирулентностью [11].

При выполнении данной работы нас интересовал вопрос изменчивости бруцелл, происходящей под влиянием фагов, изолированных из бруцелл воздействием различных факторов индукции.

Таблица 1

Биологические свойства штаммов бруцелл, полученных путем взаимодействия их со специфическими фагами

Исходные штаммы	Фаги	Полученные штаммы	Редуцирующая истивность					Лизис	Окраска	Рост на средах с пенициллином (1000 ЕД/мл)
			Гионин			Фуксин		фагом	кристалл-	
			1:25000	1:50000	1:100000	1:50000	1:100000	ТБ	виолетом (1:2000)	
54	54Ф	Ф54	-	+	+	+	+	-	S, SR	-
54	54LФ	ФД54	-	+	+	+	+	-	R	+
54	498Ф	ФМ54	-	+	+	+	+	-	SR, R	+
54	1330Ф	Ф854	-	+	+	+	+	-	R	+
498	498Ф	Ф498	-	+	+	+	+	-	S, SR	±
498	54Ф	ФА498	+	+	+	+	+	-	S, SR	-
498	1330Ф	Ф8498	-	+	+	+	+	-	S, SR	-
498	16/4LФ	ФL498	-	+	+	+	+	-	S, SR	-
1330	1330Ф	Ф1330	+	+	+	-	-	-	S, SR, R	±
1330	54Ф	ФА1330	±	+	+	-	-	-	SR, R	-
1330	498Ф	ФМ1330	+	+	+	-	-	-	SR,R	-
16/4	16/4LФ	ФL16/4	+	+	+	+	+	-	R	+

Примечания:
1. Здесь и далее, + наличие признака. - отсутствие, ± слабовыраженный признак; 2. В третьей графе первая буква «Ф» означает, что данный штамм изменен действием фага; вторая буква обозначает: «М» - данный штамм получен под влиянием фага, выделенного из B.melitensis, «S» - B.suis, «A» - B.abortus, «L» - фага, индуцированного пенициллином; отсутствие второй буквы показывает, что данный штамм изменен воздействием гомологичного фага.

В опыте использовали штаммы: Br.abortus 54, 16/4, Br.melitensis 498, Br.suis 1330. Штаммы 54, 498 и 1330 находятся в S-, 16/4 в R-форме.

На указанные штаммы действовали фагами 54Ф, 498Ф, 1330Ф, изолированными из штаммов 54, 498 и 1330 в результате индуцирующего действия УФЛ и фагами 54LФ и 16/4LФ, полученными под влиянием пенициллина на штаммы 54 и 16/4. Расшифровка обозначений штаммов фагов и полученных под их воздействием штаммов бруцелл представлены в «Примечаниях» к таблице 1.

Спектр литического действия фагов 54Ф, 1330Ф, 498Ф аналогичен таковому фага ТБ. тогда как фаги 54LФ и 16/4LФ способны лизировать культуры Br.abortus, suis. melitensis в S-, SR- и R-форме и клетки Br.ovis и Br.canis.

Взаимодействие фага и бруцелл осуществляли в жидкой питательной среде, при этом на одну микробную клетку (м.к.) добавляли 1-10 фаговых корпускул (ф.к.). После 48 час инкубации (37° С) их пересевали в пробирки с питательным агаром. Каждый штамм бруцелл выращивали с гомологичным фагом, а также выделенными из бруцелл другого вида.

Изучение измененных воздействием бактериофага культур проводили по методам, рекомендованным ФАО/ВОЗ [29]. Антигенную структуру определяли в РА на стекле с иммунными сыворотками к бруцеллам, находящимся в S-, SR-, R- и L-форме. Дополнительно у них устанавливали возможность роста на средах с различными концентрациями пенициллина.

Исследованию подвергли 12 культур бруцелл, измененных действием специфических бактериофагов. У части культур, полученных под влиянием гомологичных и гетерологичных бруцеллезных фагов и находящихся в S-, SR-и R-форме, колонии были слизистыми и при длительном хранении, с пересевами через 2-3 мес, стойко сохраняли это свойство. В то же время, бруцеллы этих штаммов не лизировались фагом ТБ и приобрели способность к спонтанной продукции фага, т.е. произошла лизогенизация бактерий.

Штаммы в R-форме становились лизогенными при добавлении бактериофагов, выделенных из трансформированных пенициллином бруцелл. Фаги, индуцированные другими способами, оказывали на них значительно меньшее действие или были индифферентными.

Таблица 2

Сравнительная характеристика лизогенных штаммов бруцелл по некоторым тестам на диссоциацию

Штаммы бруцелл	Бруцеллезная биофабричная, S	Иммунные сыворотки			Иммунные сыворотки, полученные на штаммы бруцелл			Проба с трипафавином	Термоагглютинция
		Антиабортус	Антимелитензис	Овисная биофабри'мши, R	B.abortus 82, SR	B.abortus 16/4, R	B.abortus 54 L, L		
54	+	+	-	-	+	-	±	-	-
498	+	-	+	-	+	-	-	-	-
1330	+	+	+	-	+	-	-	-	-
16/4	-	-	-	+	±	+	±	+	+
Ф54	+	+	-	-	+	±	+	+	+
OL54	-	-	-	+	-	+	+		+
ФМ54	-	-	-	+	+	+	+	+	+
OS54	-	-	-	-	+	±	+	+	+
Ф498	+	+	+	-	+	-	+	+	+
ФА498	+	-	-	-	+	±	+	+	+
ФБ498	+	-	-	-	+	±	+	+	+
ФL498	+	-	-		+	+	+	+	+
Ф133О	±	±	-	-	+	+	+	+	+
ФА1330	±	-	-	-	+	+	+	+	+
ФМ133О	-	-	-	+	+	+	+	+	+
ФL6/4	-	-	-	+	-	+	+	+	+

Бруцеллы, после взаимодействия с фагом, лишь слегка изменили свое типовое отношение к фуксину и тионину. У них более выражена потенция к росту на средах, содержащих пенициллин, что проявилось в способности к репродукции отдельных культур на средах с концентрацией антибиотика до 1000 ЕД/мл. У всех штаммов бруцелл наблюдался процесс диссоциации, что выразилась в появлении колоний, которые по Уайт-Вильсону окрашивались в синий и фиолетовый цвета (R-форма) или имели окрашенный ободок (SR-). (таблица 1).

Изменения произошли и в антигенной структуре, о чем свидетельствовали результаты пластинчатой РА с бруцеллезными иммунными сыворотками (таблица 2).

Как свидетельствуют данные, представленные в таблице 2, штаммы ФL54 и OS54 в отличие от исходного (54) перестали агглютинироваться бруцеллезной биофабричной сывороткой. R-сыворотка 16/4 агглютинировала штаммы ФL54, Ф1330, ФL16/4 и ФL498. С L-сывороткой 54L реакция была позитивной у всех культур бруцелл, что показывает тесную антигенную связь бруцелл, измененных воздействием фага и L-трансформированных пенициллином. В РА с монорецепторными сыворотками культуры, имеющие положительные результаты с S-бруцеллезной сывороткой, не изменили своего видового отношения к ним, кроме штамма B.melitensis Ф498, который, помимо агглютинации сывороткой антимелитензис, вступал в реакцию с сывороткой антиабортус. Таким образом, установленные в РА антигенные связи между штаммами, полученными под воздействием специфических фагов, показывают определенную общность их антигенных структур.

Также обнаружено, что в зависимости от того, из какого штамма и каким фактором индуцировали фаг, последний способен оказывать различное действие на бруцеллы. Например, штамм Ф54, измененный действием гомологичного фага (54Ф), приобрел свойство агглютинироваться SR- и L-бруцеллезными сыворотками. По Уайт-Вильсону колонии окрашивались как S-и SR-форма. Воздействие фага 498Ф привело к тому, что измененный штамм ФМ54

имел в своем составе только диссоциированные бруцеллы (SR- и R-форма). Под влиянием фага 1330Ф получили штамм Ф854 (R-форма), который не вступал в реакцию с S-сывороткой, не лизировался фагом ТБ, агглютинировался L- и SR-иммунными сыворотками. У штамма ФL54, измененного действием фага 54LФ, свойства изменились в большей степени, чем под действием фагов, индуцированных влиянием УФЛ. Полученная культура не вступала в реакцию с S- и SR- и хорошо агглютинировалась R- и L - бруцеллезными сыворотками. Подобные изменения отмечены и у других штаммов, измененных воздействием фагов.

Как свидетельствуют данные экспериментов, лизогения и диссоциация бруцелл взаимосвязаны – вначале происходит индукция бактериофагов под влиянием каких-либо внешних или внутренних факторов биотического или абиотического характера на микробную клетку (лизогенизация) и лишь затем наблюдается процесс диссоциации, т.е. переход бруцелл из S- в R- или L-форму, т.к. нами ранее было установлено, что L-формы и диссоциированные под влиянием фага бруцеллы имеют тождественные биологические признаки [30].

Результаты исследований также демонстрируют, что степень вариабельности бруцелл. измененных под влиянием фагов, находится в прямой зависимости от свойств последних, т.е. видовая специфичность бактерий, в том числе и бруцелл, целиком определяется фагами, находящимися в состоянии профага, а бактериальная клетка является лишь методом и средством для фенотипического выражения генетической информации, заложенной в фаговом геноме.

Литература

1. Стент Г., Кэлиндар Р. Молекулярная генетика М.: Мир, 1981. 646 с.
2. Сокин А.А. Парадокс инфекционного иммунитета // ЖМЭИ. 1988. № 1. С. 73-80.
3. Макаров В.В., Гусев А.А. и др. Трансмиссивные детерминанты патогенности // Ветеринария. - 2000. № 3. С. 16-21.
4. Беляков В.Д., Голубев Д.Б. и др. Саморегуляция паразитарных систем (молекулярно-генетические механизмы). Л.: Медицина, 1987. 240 с.
5. Астафьев Б.А., Петров О.Е. Генетические основы паразитизма //Вет. патология. 2004. № 3. С. 13-19.
6. Жемчугов В.Е. Механизмы сохранения и распространения патогенных микроорганизмов (гипотеза) //Эпидемиол. и инф. бол. 2004. № 3. С. 13-19.
7. Земсков М.В., Скалов М.И., Земсков В.М. Основы общей микробиологии, вирусологии и иммунологии. М.: Колос, 1972. 287 с.
8. Терехова Т.К. О трансдуцирующих свойствах стафилококковых фагов // Теоретические и практические вопросы бактериофагии. Тбилиси, 1974. С. 177-178.
9. Matic I Bacteriophages and virulence evolution // Frends Microbiol. 1999. № 11. P. 433.
10. Бакулина Э.В., Олейник И.И. Теория паразитоценозов и генетический обмен у бактерий. М.: Медицина, 1970. 216 с.
11. Косилов И.А. Изменчивость бруцелл и ее значение в проблеме бруцеллеза сельскохозяйственных животных: автореф. д-ра вет.наук. Фрунзе, 1975. 40 с.
12. Renoux G., Swire A. Spontanus lisis and phage carrier state in Brucella cultures //J.Bact. 1963. T. 86. V.I. P. 51-56.
13. Островская Н.Н. Бруцеллезные бактериофаги и их значение в изменчивости бруцелл: автореф. д-ра мед. наук. М., 1969. 32 с.
14. Дубровская И.И., Островская Н.Н. Изменение антигенных комплексов бруцелл под влиянием фага // Биохимия. 1961. Вып. 2. С. 250-255.
15. Браун В. Генетика бактерий: Пер. с англ. М.: Наука, 1968. 446 с.
16. Горелов В.Н., Селютина Д.Ф. и др. Разработка метода генетического анаяиза бруцелл // Актуальные вопросы проф. и организации мед. помощи больным. М., 1983. С. 78-79.
17. Rigby C, Fraoles A. Plasmid trausfer and plasmidmediated genetic exhange in Brucella abortus // Canad. J. Vet. Res. 1989. №3. P. 326-330.
18. Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Проблемы применения бактериофагов в ветеринарии // Вестник ветеринарии. Оренбург, 2002. Вып. 5. С. 93-99.
19. Воробьев А.Л., Султанов А.А., Тен В.Б. Бактериофаги и вирулентность бруцелл // Ветеринария. 2005. № 10. С. 27-29.
20. Таран И.Ф., Погорелов Н.А., Сафронова В.М. Влияние бруцеллезного бактериофага ТБ на характер инфекционного процесса при бруцеллезе в опытах на морских свинках // Особоопасные инфекции на Кавказе: тез. докл. 3-ей научно-практ. конф. противочумных учреждений Кавказа. Ставрополь, 1974. Вып. 2. С. 116-119.
21. Петровская В.Г. Проблемы вирулентности бактерий. М.: Медицина, 1967. 262 с.
22. Зуева В.С., Дмитриева О.А., Клищук Н.В. Роль профагов в формировании антибиотикоустойчивых популяций стафилококков в процессе трансформации, трансдукции и конъюгации // Антибиотики и химиотерапия. 1996. Т. 41. № 10. С. 36-42.
23. Островская Н.Н. Изменчивость бруцелл под влиянием бактериофага и перспектива получения новых вакцинных штаммов // Изменчивость микроорганизмов и бактериофагия. М.: Медицина, 1960. С.300.
24. Перетц Л.Г. Значение изменчивости микробов для эпидемиологии и клиники инфекционных заболеваний // Изменчивость микроорганизмов и бактериофагия. М.: Медицина, 1960. С. 237-245.
25. lanes W., Beam R., David H. Transduction of streptomicin R-factor frau Mycobacterium snugmatis to Mycobacterium tuberculosis H37RV//Tubercule. 1974. V 55. P. 73/
26. Милютин В.Н., Дрожевкина М.С. и др. Конверсия холерных вибрионов в R-форму // ЖМЭИ. 1982. № 2. С. 46-49.
27. Обухова Н.А., Егорова Н.С. и др. Сравнение микрогенных свойств S, R и М-вариантов // Бюл.науки. 1982. № 4. С. 81-85.
28. Резников Б.Ф. Индуцированная адаптация бруцелл к питательным средам // Ветеринария. 1975. № 7. С. 35-37.
29. FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. Sixth Report Technical Report Series № 740. World Health Organisation Geneva. 1986. 133 p.
30. Воробьев А.Л. Фаги бруцелл и их иммунобиологическией свойства: автореф. д-ра биол. наук. Алматы, 2006. 45 с.